## 与拟除虫菊酯抗性相关的烟粉虱 钠通道基因突变及其检测

王利华, 吴益东\*

(南京农业大学植物保护学院昆虫系,农业部病虫监测与治理重点开放实验室,南京 210095)

摘要:通过 RT-PCR 克隆了烟粉虱 Bemisia tabaci (Gennadius)南京种群(B-生物型)的钠离子通道结构域 || S4-6 cDNA 片段,证实了与拟除虫菊酯抗性相关的是位于第 925 位亮氨酸到异亮氨酸的突变(L925I),并建立了 L925I 突变的 PASA 检测技术。与 SUD-S 敏感品系相比,2002 年采自南京棉花上的烟粉虱种群对氯氰菊酯具有 77 倍的抗性,用氯氰菊酯对该种群进行多次筛选后,该种群对氯氰菊酯的抗药性提高到 227 倍。PASA 检测结果表明筛选后的南京种群中 100%个体都具有 L925I 突变(61.1%的个体为 L925I 突变纯合子,38.9%的个体为杂合子),而未筛选的南京种群只有 75%个体具有 L925I 突变(35%个体为 L925I 突变纯合子,40%的个体为杂合子,25%的个体为野生型)。该结果表明了烟粉虱钠离子通道 L925I 突变与对拟除虫菊酯抗性密切相关。还讨论了烟粉虱对拟除虫菊酯抗性的代谢机理。

关键词: 烟粉虱: 拟除虫菊酯: 抗药性: 钠离子通道: 基因突变

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2004)04-0449-05

# A mutation in sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in *Bemisia* tabaci (Gennadius) and its detection

WANG Li-Hua, WU Yi-Dong\* (Department of Entomology, College of Plant Protection & Key Laboratory of Monitoring and Management of Plant Diseases and Insects, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: A mutation, leucine to isoleucine at position 925 (L925I) in the [] S4 – 6 linker of the para-type sodium channel protein from the Nanjing strain (B-biotype) of the tobacco whitefly, Bemisia tabaci (Gennadius) was identified to be associated with pyrethroid resistance. The DNA-based genotyping technique PASA (PCR amplification of specific allele) for rapid detection of the L925I mutation was established. The Nanjing strain collected from cottons in Nanjing in 2002 showed 77-fold resistance to cypermethrin compared with the susceptible SUD-S strain. The resistance to cypermethrin in the selected Nanjing strain increased to 227-fold after several selections with cypermethrin. PASA genotyping results indicated that 100% individuals from the selected Nanjing strain had L925I mutation (61.1% homozygotes and 38.9% heterozygotes), whereas only 75% individuals from the unselected Nanjing strain had L925I mutation (35% homozygotes, 40% heterozygotes and 25% wild type). Our results indicated that L925I mutation was tightly associated with pyrethroid resistance in the tobacco whitefly from Nanjing. Possible metabolic mechanisms for pyrethroid resistance in this strain were discussed.

Key words: Bemisia tabaci; pyrethroid; resistance; sodium channel; gene mutation

烟粉風 Bemisia tabaci (Gennadius)属于同翅目粉 虱科,目前已经成为一种重要的世界性害虫,它不但直接刺吸植物营养,而且能够传播病毒病(Brown, 1994)。我国最早关于烟粉虱发生的报道始于 1949

年,长期以来烟粉虱都是次要害虫,不引起重大的经济损失(罗晨和张芝利,2000)。自 1997 年在广东局部地区发生危害以来,逐年加重,在我国逐渐成为重要的农业和园林害虫(张芝利,2000)。

基金项目: 国家"863"项目(2001AA249041);高等学校优秀青年教师教学科研奖励计划

作者简介: 王利华,女,1979年生,在读博士生,研究方向为昆虫分子毒理学

<sup>\*</sup> 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: wyd@njau.edu.cn

收稿日期 Received: 2003-12-08; 接受日期 Accepted: 2004-02-10

拟除虫菊酯类杀虫剂是一类广谱性杀虫剂,具有高效、低毒和低残留的特性,在农业、林业和卫生害虫防治中广泛应用,由于大量无节制的使用,很多害虫对其产生抗药性。目前烟粉虱的防治仍然以化学农药为主,国外已有烟粉虱对拟除虫菊酯类杀虫剂产生抗药性的报道。Cahill 和 Byme(1995)测定了苏丹、以色列、美国及巴基斯坦棉花上的烟粉虱对氯氰菊酯、联苯菊酯和醚菊酯的抗性,其抗性倍数从2倍到380倍。Ahmad 和 Arif(2001)测定了巴基斯坦各地的烟粉虱对溴氰菊酯、甲氰菊酯、三氟氯氰菊酯和联苯菊酯的抗性,其抗性倍数从几倍到几百倍。Kranthi和 Jadhav(2002)测定了印度烟粉虱对氯氰菊酯的抗性,其抗性倍数从5倍到45倍。但在我国烟粉虱对拟除虫菊酯类杀虫剂的抗性还未见报道。

拟除虫菊酯类杀虫剂作用于昆虫神经系统钠离子通道,延长钠离子通道开放时间,引起重复后放。昆虫对拟除虫菊酯类杀虫剂产生抗性的重要机理之一是神经靶标敏感性下降,即击倒抗性(knock down resistance, Kdr)。自 Williamson 等(1996)最早报道了家蝇对拟除虫菊酯击倒抗性的产生是由于钠离子通道基因发生点突变以来,相继在 5 个目的 11 种昆虫中发现了与击倒抗性有关的钠离子通道基因点突变(Soderlund and Knipple, 2003)。

我们发现南京地区烟粉虱对氯氰菊酯已经产生了高水平抗性,证实烟粉虱钠通道蛋白在 925 位的亮氨酸到异亮氨酸(L925I)的突变与拟除虫菊酯抗性密切相关,并建立了基于基因组 DNA 的 PASA (PCR amplification of specific allele)检测技术,可对该突变进行准确和快速的检测。

## 1 材料和方法

#### 1.1 供试昆虫

2002年从南京农业大学卫岗试验地的棉花上采集烟粉虱,在室内用棉花植株进行饲养。该种群的烟粉虱危害西葫芦后能产生典型的银叶症状,并结合酯酶同工酶的带型,确定其生物型为B型。将该种群分为两部分:一部分不接触任何药剂,为南京品系(NJ品系);另一部分用氯氰菊酯筛选,为南京筛选品系(NJ-cypermethrin 品系)。SUD-S 为烟粉虱标准敏感品系,由英国 Rothamsted Research 赠送。

### 1.2 生物测定

参考 Morin 等(2002)的方法。将新鲜棉花叶片 打成直径为 3.5 cm 的圆片,在系列浓度药液中浸渍 10 s,自然状态下晾干;将晾干后的叶片正面向下铺在直径为 3.5 cm 的培养皿(培养皿内事先倒入 1%的琼脂)中;将 25 头雌成虫接到棉花叶片上,盖上盖子;1 h 后检查接入的雌成虫的状况,若已死亡不计入接入虫数中。检查完毕后将培养皿倒置于  $27^{\circ}$ C、相对湿度 60% 的培养箱中,48 h 后检查死亡率。每个浓度设 3 个重复。采用死亡率机率值分析法计算毒力回归线和  $LC_{50}$  (mg/L)。

## **1.3** RT-PCR 扩增钠离子通道基因结构域 **I** S4 - 6 片段

用 Promega 公司的总 RNA 提取试剂盒,分别提 取 50 头南京和南京筛选品系雌、雄虫总 RNA。以所 提取的总 RNA 为模板, OligodT 为引物, 在反转录酶 的作用下合成第一链 cDNA,然后经两轮 PCR 扩增 后得到目标片段(约390 bp)。根据 GenBank 中注册 的烟粉虱 SUD-S 品系钠通道结构域 Ⅱ cDNA 序列 (注册号: AI440727)设计 2 对嵌套的特异性引物 (Kdr-1: 5'-GCCAAATCCTGGCCAACTTTG-3'; Kdr-2: 5'-TTCGTTGTCAGCTGTTGGC-3'; Kdr-3: 5'-GGCCAAC TITGAATCTGTTG-3': Kdr-4: 5'-TGTTGGCGCCGAT AAGCTTG-3')。第一轮 PCR 扩增以 cDNA 为模板,以 Kdr-1 为上游引物、Kdr-2 为下游引物, 扩增 35 个循 环(反应体积为 50 µL,94℃变性 1 min,50℃退火 1 min,72℃延伸 2 min); 第二轮 PCR 扩增以 1 μL 第一 轮反应产物为模板, Kdr-3 和 Kdr-4 分别为上、下游 引物,扩增25个循环(与第一轮反应条件一样)。第 二轮 PCR 扩增所得 390 bp 左右的片段即为目标片 段。采用 pGEM-T easy 系统(Promega)克隆目标片 段,克隆产物送大连 TaKaRa 公司测序。

### 1.4 基因组 DNA 的提取

参考安瑞生等(2002)的方法配制 A、B 两种溶液。先将烟粉虱置于 - 20℃的冰柜中 10 min,然后取单头烟粉虱成虫于 Eppendorf 管中,加入 120 μL A 液匀浆,65℃水浴 45 min,取出后加等体积的 B 液,冰上放置 30 min,12 000 r/min 离心 10 min,移上清液于另一新的 Eppendorf 管中,重复 1 次;在上清液中加入 2 倍体积预冷的无水乙醇,—20℃贮存。

#### 1.5 PASA 检测抗性基因突变

设计分别与烟粉虱钠离子通道 L925I 突变型和野生型匹配的两个上游引物 Kdr-A(5'-CCGAACAGTT GGGGCC A-3') 和 Kdr-T(5'-CCGAACAGTTGGGGCCT -3')。为了便于直接用基因组 DNA 进行 PASA 检测,下游引物 Kdr-PASA(5'-CTTTCCGCACCTCTGATGG GC-3')是根据 L925I 突变位点下游第一个内含子的

序列设计的。采用具有高保真性能的 Pyrobest™ DNA 聚合酶(大连 TaKaRa 公司)进行 PCR 反应。PASA 检测的目标片段为 320 bp,反应产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测。检测对象为单头雌成虫。只在用 Kdr-T/Kdr-PASA 引物组合检测才出现目标片段,表明该个体为野生型;只在用 Kdr-A/Kdr-PASA 引物组合检测才出现目标片段,表明该个体为 L925I 突变纯合子;在用 Kdr-A/Kdr-PASA 引物组合和 Kdr-T/Kdr-PASA 引物组合分别进行检测都出现目标片段,表明该个体为 L925I 突变杂合子。

## 2 结果与分析

#### 2.1 抗性测定

南京品系和南京筛选品系对氯氰菊酯的生测结果见表 1。与 SUD-S 敏感品系相比,南京品系对氯氰菊酯有 77 倍的抗性,南京筛选品系对它的抗性增加到 227 倍。南京筛选品系与南京品系相比较,其对氯氰菊酯的抗性提高了大约 3 倍。

表 1 氯氰菊酯对南京品系和南京筛选品系烟粉虱的毒力 Table 1 Toxicity of cypermethrin to NJ strain and NJ-cypermethrin strain of *Bemisia tabaci* 

品系 Strain	LC <sub>50</sub> (mg/L)	95%置信限 95%FL	斜率 Slope	抗性比值 RF*
南京品系 NJ strain	277.26	240.77 - 342.47	2.36	77
南京筛选品系 NJ-cypermethrin strain	817.04	668.92 - 1 025.18	1.64	227

<sup>\*</sup> 抗性比值为测试种群  $LC_{50}$ 与 SUD-S 敏感品系  $LC_{50}$ (3.6 mg/L)之比。

# 2.2 烟粉虱钠离子通道结构域 II S4 - 6 片段的碱基序列

通过 RT-PCR 获得南京品系和南京筛选品系的雌雄虫钠离子通道结构域 [[S4-6 片段(390 bp)。将南京品系、南京筛选品系和 SUD-S 敏感品系的序列进行排列(图 1),发现南京品系和南京筛选品系

的第 52 位碱基为 A,而在 SUD-S 敏感品系中相应位点的碱基为 T。该碱基突变导致相当于家蝇钠离子通道序列第 925 位氨基酸由亮氨酸变为异亮氨酸 (L925I)。该突变位点相当于家蝇抗拟除虫菊酯品系钠离子通道 Super-kdr 突变,因此推测 L925I 突变在烟粉虱对拟除虫菊酯类杀虫剂的抗性产生可能具有重要作用。

### 2.3 PASA 检测抗性突变基因

对单头烟粉虱雌成虫基因组 DNA 样品分别用 Kdr-T/Kdr-PASA 引物组合和 Kdr-A/Kdr-PASA 引物组合进行 L925I 突变的 PASA 检测。PASA 检测结果见图 2。敏感野生型个体在 Kdr-T/Kdr-PASA 引物组合中出现目标片段,在 Kdr-A/Kdr-PASA 引物组合中不出现目标片段。而 L925I 突变纯合子在 Kdr-A/Kdr-PASA 引物组合中出现目标片段,在 Kdr-T/Kdr-PASA 引物组合中出现目标片段。L925I 突变杂合子在两个引物组合中均出现目标片段。利用该方法可以准确和快速地检测单头烟粉虱成虫钠离子通道第 925 位点的基因型。

## 2.4 L925I 突变在烟粉虱对氯氰菊酯抗性中的意义

采用 PASA 技术检测了南京品系、南京筛选品系和 SUD-S 敏感品系 L925I 的突变情况。检测结果(表2)表明:南京品系有 35%突变纯合子、40%杂合子和 25% 野生型纯合子;南京筛选品系有 61.1%的突变纯合子和 38.9%杂合子,没有检测到野生型纯合子。南京品系经过氯氰菊酯筛选后对氯氰菊酯的抗性提高了约 3 倍的同时,野生型纯合子由 25%减少到 0,1925I 突变纯合子由 35% 提高到 61.1%,杂合子的比例都在 40%左右。SUD-S 敏感品系所有的个体均为野生型。用 1 827 mg/L 氯氰菊酯处理南京品系,提取 10 头处理后存活下来的成虫的基因组DNA,经 PASA 检测,所有存活个体均为 L925I 突变纯合子。由此可见,L925I 突变与烟粉虱对氯氰菊酯的抗性密切相关。

表 2 烟粉虱雌成虫 L925I 突变的频率分布(PASA 检测)

Table 2 Distribution of L925I mutation in the female adults of Bemisia tabaci (PASA analysis)

品系 Strain	检测总虫数(头) Number of individuals detected	L9251 纯合子(头) Homozygote	L9251 杂合子(头) Heterozygote	野生型(头) Wild type
南京品系 NJ strain	20	7	8	5
南京筛选品系 NJ-cypermethrin strain	18	11	7	0
SUD-S 敏感品系 SUD-S susceptible strain	31	0	0	31

<sup>\*</sup> RF = LC<sub>50</sub> of tested strain/LC<sub>50</sub> of SUD-S strain(3.6 mg/L).

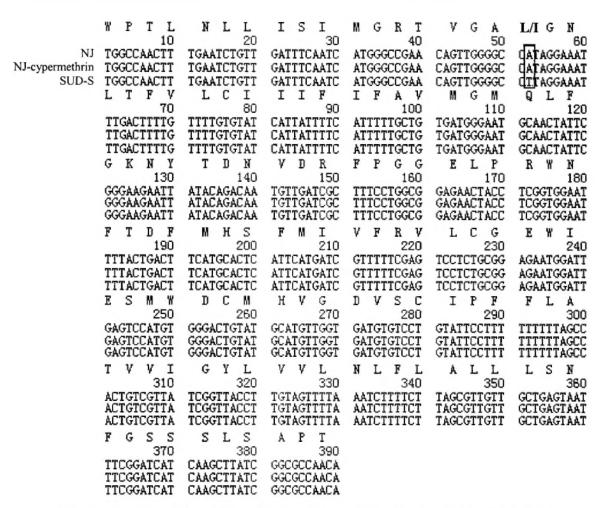


图 1 南京品系和南京筛选品系钠离子通道结构域 II S4-6 区段的碱基序列及推导的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of the domain 

∏ S4 – 6 region of the Bemisia tabaci sodium channel from NJ and NJ-cypermethrin strains

方框內为突变碱基 The only mutation is at position 52(box);NJ:南京品系 Nanjing strain; NJ-cypermethrin:南京筛选品系 Cypermethrin-selected NJ strain; SUD-S:敏感品系 Susceptible strain.

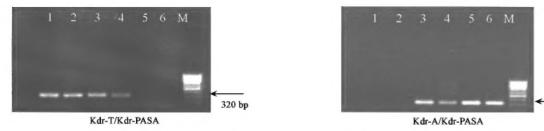


图 2 Kdr-T/Kdr-PASA 和 Kdr-A/Kdr-PASA 引物组合 PASA 扩增结果的凝胶分析( 箭头所示为 320 bp 的 PCP 扩增片段 )

Fig. 2 Gel analysis of PASA amplification using Kdr-T/Kdr-PASA and Kdr-A/Kdr-PASA

primer combinations (Arrow indicated the 320 bp product of PCR)

: DNA 分子量标准 DNA marker; Lane 1,2: 野生型 Wild type; Lane 3,4: 突变杂合子 L925I heterozygote; Lane 5,6: 突变纯合子 L925I homozygote.

## 3 讨论

钠离子通道氨基酸突变导致钠离子通道对药剂 敏感性下降是昆虫对拟除虫菊酯类杀虫剂产生抗药 320 bp

发现;还有一些突变发生在结构域之间或结构域内跨膜蛋白之间;在德国蜚蠊 Blattella germanica 的拟除虫菊酯高抗品系中还发现两个位于四个同源结构域外的突变(P1999L、D59G)。家蝇 Musca domestica钠离子通道基因突变可以分为两类,即 Kdr 突变和Super-kdr 突变。Kdr 突变(L1014F)位于钠离子通道同源结构域 [[S6,是拟除虫菊酯类杀虫剂抗性昆虫品系中最常见的突变; Super-kdr 突变(M918T)从不单独发生,总是出现在已产生 Kdr 突变的昆虫中,增加昆虫对拟除虫菊酯类杀虫剂的抗药性(Soderlund and Knipple, 2003)。

Morin 等(2002)研究发现烟粉虱 AZ-R 高抗品系 中存在与拟除虫菊酯抗性相关的 M918V 和 L925I 两 个突变,但是在田间采集的多个品系中只有 L925I 突变, 而没有发现 M918V 突变。用直接测序法检测 采自美国亚利桑那州地区的9个田间品系经区分剂 量处理存活下来的雄成虫基因型,发现它们都是 19251 突变纯合子。我们的研究结果表明,在对氯氰 菊酯产生抗性的南京烟粉虱种群中只有 L925I 突 变,未发现 M918V 突变。钠离子通道突变在提高昆 虫对拟除虫菊酯类杀虫剂抗药性的同时,也可能使 昆虫适合度下降。如黑腹果蝇 Drosophila melanogaster 钠离子通道的 4 个突变 I253N、A1410V、 A1494V 和 M1524I 能使其发生温度敏感性瘫痪 (Soderhad and Knipple, 2003)。 烟粉虱的 M918V 突变 也可能带来适合度缺陷,从而使该突变在田间种群 中消失。

Byrne 等(2000)认为 B 型烟粉虱对拟除虫菊酯 类杀虫剂的抗性与 E<sub>0.14</sub> 酯酶有关,但经过分离得到 的没有 E<sub>0.14</sub> 酯酶的 B 型烟粉虱对氯菊酯仍有一定的 抗性,因此不能排除其他抗性机理的参与(如神经不 敏感性等)。我们在实验中发现南京筛选品系和南 京对照品系(B型)酯酶活性没有差异,但它们的酯 酶活性比非 B 型烟粉虱酯酶活性约高 6 倍(未发表 数据)。由此,我们认为不同生物型之间酯酶活性的 差异能造成对拟除虫菊酯类杀虫剂敏感性差异。B 型烟粉虱对拟除虫菊酯类杀虫剂的高抗性与钠离子 通道 L925I 突变和酯酶均有关系,但这两种机理之 间的相互作用关系还有待进一步研究。

拟除虫菊酯类杀虫剂的作用位点是昆虫中枢神 经系统钠离子通道,目前对钠离子通道基因碱基序 列、氨基酸构成以及功能都了解得较为清楚,在此基 础上采用 PASA 技术可以更快速和更准确地监测害 虫对拟除虫菊酯类杀虫剂的抗性基因突变频率,而 对抗药性分子机制了解不清楚的昆虫无法用该技术 检测抗性基因频率。因此,应适当超前研究害虫对 新型杀虫剂抗性的分子机理,在田间出现抗性问题 之前能够开发出相应的早期抗性检测技术,这样才 能够对害虫抗药性治理策略的制定起指导作用。

#### 参考文献(References)

- Ahmad M, Arif MI, 2001. Cotton whitefly (*Bemisia tabaci*) resistance to organophosphate and pyrethroid insecticides in Pakistan. *Pest Management Science*, 58: 203 208.
- An RS, Tan SJ, Chen XF, 2002. Improvement in grinding tissue during extracting DNA from small insects. *Entomological Knowledge*, 39(4): 311-312.[安瑞生,谭声江,陈晓峰,2002.小型昆虫 DNA 提取时 匀浆方法的改进.昆虫知识,39(4): 311-312]
- Brown JK, 1994. Current status of *Bemisia tabaci* as a plant pest and virus vector in agro-ecosystems worldwide. *FAO Plant Protection Bulletin*, 42: 3-32.
- Byrne FJ, Gorman KJ, Cahill M, Denholm I, Devonshire AL, 2000. The role of B-type esterases in conferring insecticide resistance in the tobacco whitefly, Benisia tabaci (Genn.). Pest Management Science, 56: 867 874.
- Cahill M, Byrne FJ, 1995. Pyrethroid and organophosphate resistance in the tobacco whitefly Bemisia tabaci. Bulletin of Entomological Research, 85: 181 – 187.
- Kranthi KR, Jadhav DR, 2002. Insecticide resistance in five major insect pests of cotton in India. Crop Protection, 21: 449 – 460.
- Luo C, Zhang ZL, 2000. Study progress on *Bemisia tabaci* (Gennadius).

  Beijing Agricultural Science, 18: 4 13.[罗晨,张芝利, 2000.烟粉 虱 *Bemisia tabaci* (Gennadius)研究概述.北京农业科学(增刊), 18:4-13]
- Morin S, Williamson MS, Goodsons J, Brown JK, Tabashnik BE, Dennehy TJ, 2002. Mutations in the *Bemisia tabaci para* sodium channel gene associated with resistance to a pyrethroid plus organophosphate mixture. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32: 1 781 – 1 791.
- Soderlund DM, Knipple DC, 2003. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33: 563 577.
- Williamson MS, Martinez-Torres D, Hick CA, Devonshire AL, 1996.
  Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance to pyrethroid insecticides.
  Mol. Gen. Genet., 252: 51 60.
- Zhang ZL, 2000. Some thoughts to the outbreaks of tobacco whitefly. *Beijing Agricultural Science*, 18: 1-3.[张芝利, 2000.关于烟粉虱大发生的思考. 北京农业科学(增刊),18: 1-3]

(责任编辑: 黄玲巧)